

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/EP05/000987

International filing date: 01 February 2005 (01.02.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: IT
Number: MI2004A000164
Filing date: 03 February 2004 (03.02.2004)

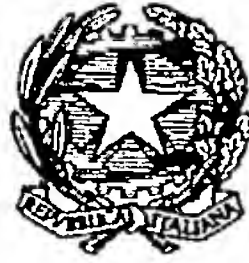
Date of receipt at the International Bureau: 04 April 2005 (04.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

90/ per



Ministero delle Attività Produttive

Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività

Ufficio Italiano Brevetti e Marchi

Ufficio G2

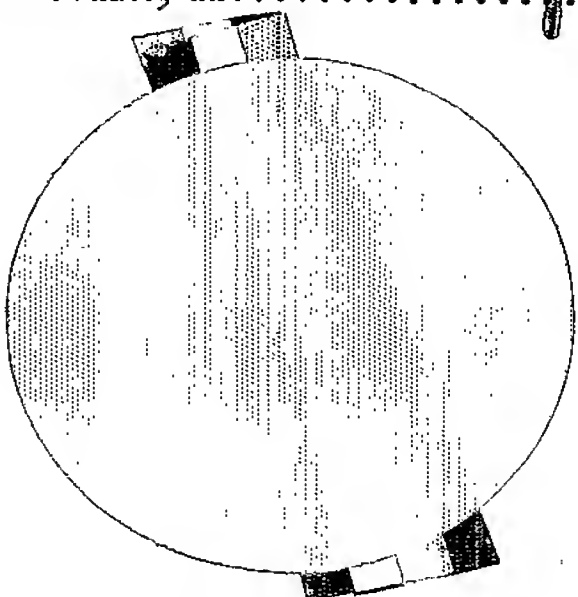


**Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per:
INVENZIONE INDUSTRIALE N. MI 2004 A 000164**

EP/05/987

Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali
depositati con la domanda di brevetto sopra specificata, i cui dati
risultano dall'accluso processo verbale di deposito.

Roma, li.....**16 FEB. 2005**



IL FUNZIONARIO

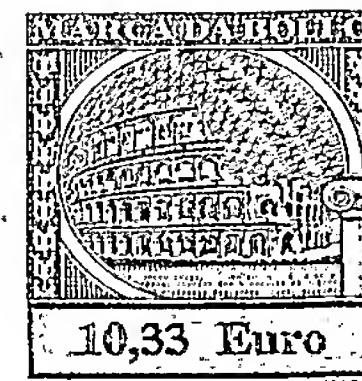
Paola Giuliano
.....
Dr.ssa Paola Giuliano

MODULO A (1/2)

AL MINISTERO DELLE ATTIVITA' PRODUTTIVE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI (U.I.B.M.)

MI 2004 A 0 0 0 1 6 4

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE N°

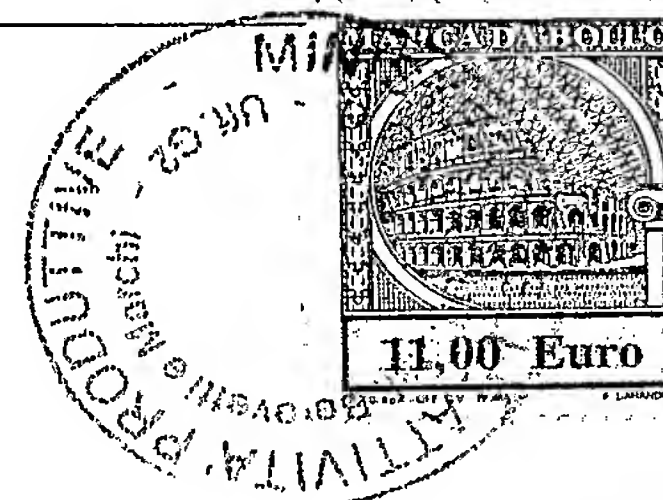


A. RICHIEDENTE/I

COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	A1	INDENA S.p.A.		
NATURA GIURIDICA (PF/PG)	A2	PG	COD. FISCALE PARTITA IVA	A3 04411780150
INDIRIZZO COMPLETO	A4	MILANO		
B. RECAPITO OBBLIGATORIO IN MANCANZA DI MANDATARIO	B0	(D = DOMICILIO ELETTIVO, R = RAPPRESENTANTE)		
COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	B1			
INDIRIZZO	B2			
CAP/LOCALITÀ/PROVINCIA	B3			
C. TITOLO	C1	"DERIVATI DI N-DEACETILTIOCOLCHICINA, LORO USO E FORMULAZIONI FARMACEUTICHE CHE LI CONTENGONO"		

D. INVENTORE/I DESIGNATO/I (DA INDICARE ANCHE SE L'INVENTORE COINCIDE CON IL RICHIEDENTE)

COGNOME E NOME	D1	BOMBARDELLI EZIO
NAZIONALITÀ	D2	
COGNOME E NOME	D1	FONTANA GABRIELE
NAZIONALITÀ	D2	
FIRMA DEL/DEI RICHIEDENTE/I	BRACCO MAURO 	



MODULO A (2/2)

I. MANDATARIO DEL RICHIEDENTE PRESSO L'UIBM

LA/E SOTTOINDICATA/E PERSONA/E HA/HANNO ASSUNTO IL MANDATO A RAPPRESENTARE IL TITOLARE DELLA PRESENTE DOMANDA INNANZI ALL'UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI CON L'INCARICO DI EFFETTUARE TUTTI GLI ATTI AD ESSA CONNESSI (DPR 20.10.1998 N. 403).

NUMERO ISCRIZIONE ALBO COGNOME E NOME;	I1	BIANCHETTI GIUSEPPE ED ALTRI
DENOMINAZIONE STUDIO	I2	BIANCHETTI BRACCO MINOJA S.r.l.
INDIRIZZO	I3	Via Rossini 8
CAP/LOCALITÀ/PROVINCIA	I4	20122 MILANO (MI)
TELEFONO		02/76021218
FAX		02/783078 - 02/76024366
E-MAIL		mailbox@scb.it
L. ANNOTAZIONI SPECIALI	L1	LETTERA INCARICO (CON RISERVA)

M. DOCUMENTAZIONE ALLEGATA O CON RISERVA DI PRESENTAZIONE

Tipo DOCUMENTO	N. Es. ALL.	N. Es. RIS.	N. PAG. PER ESEMPLARE
PROSPETTO A, DESCRIZ., RIVENDICAZ. (OBBLIGATORIO 1 ESEMPLARE)	1		16
DISEGNI (OBBLIGATORI SE CITATI IN DESCRIZIONE, 1 ESEMPLARE)			
DESIGNAZIONE D'INVENTORE			
DOCUMENTI DI PRIORITÀ CON TRADUZIONE IN ITALIANO			
AUTORIZZAZIONE O ATTO DI CESSIONE			
	(SI/NO)		
LETTERA D'INCARICO	NO		
PROCURA GENERALE			
RIFERIMENTO A PROCURA GENERALE			
	(EURO)		
ATTESTATI DI VERSAMENTO	EURO	CENTOTTANTOTTO/51#	
DEL PRESENTE ATTO SI CHIEDE COPIA AUTENTICA? (SI/NO)	SI		
SI CONCEDE ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO? (SI/NO)	NO		
DATA DI COMPILAZIONE	03/02/2004		
FIRMA DEL/DEI RICHIEDENTE/I	BRACCO MAURO		

VERBALE DI DEPOSITO

NUMERO DI DOMANDA	MI 2004 A 0 0 0 1 6 4		
C.C.I.A.A. DI	MILANO		Cod. 15
IN DATA	3 FEB. 2004	IL/I RICHIEDENTE/I SOPRAINDICATO/I HA/HANNO PRESENTATO A ME	
LA PRESENTE DOMANDA CORREDATA DI N.		FOGLI AGGIUNTIVI PER LA CONCESSIONE DEL BREVETTO SOPRARIPORTATO.	
N. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE			
IL DEPOSITANTE	TIMBRO DELL'UFFICIO	L'UFFICIALE ROGANTE	
Daniela Job	COMMERIO IND. ART.	CORTONESI MAURIZIO	

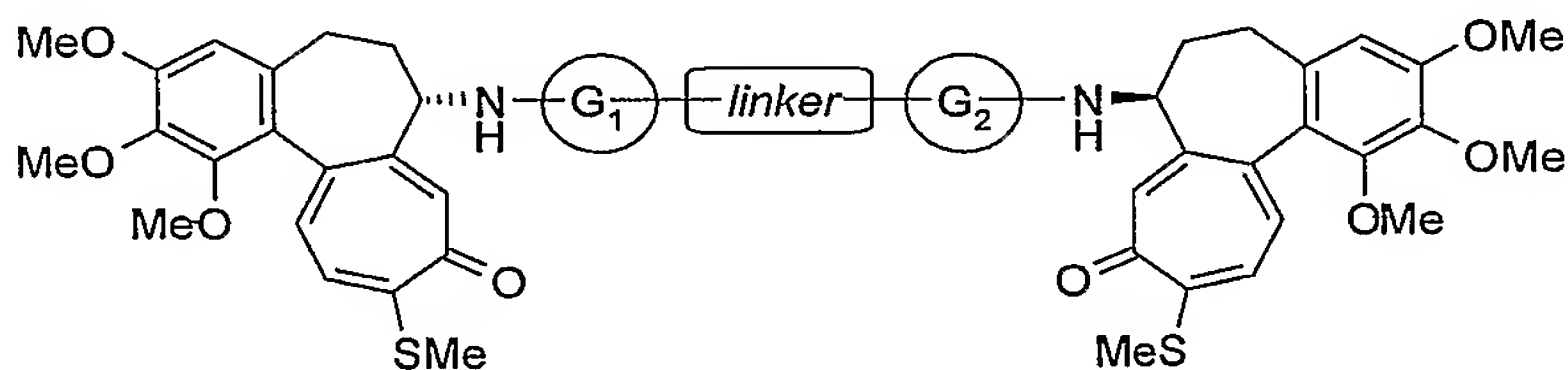
PROSPETTO MODULO A
DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE

MI 2004 A 0 0 0 1 6 4

NUMERO DI DOMANDA:		DATA DI DEPOSITO:	
28 FEB. 2004			
A. RICHIEDENTE/I COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE, RESIDENZA O STATO			
INDENA S.p.A. Milano			
C. TITOLO			
"DERIVATI DI N-DEACETILTIOCOLCHICINA, LORO USO E FORMULAZIONI FARMACEUTICHE CHE LI CONTENGONO"			

O. RIASSUNTO

Si descrivono una serie di derivati di N-deacetiltiocolchicina di formula I



in cui:

- il *linker* è un residuo bivalente alchilico lineare o ramificato C₁-C₈, cicloalchilico C₃-C₈, un anello fenilenico o eterociclico C₄-C₆;
- le giunzioni G₁ e G₂, uguali o diverse, sono gruppi -CO-, -CONH-, -CR₂- in cui R₂ rappresenta idrogeno o un residuo alchilico lineare C₁-C₄,

oppure il gruppo G₁-*linker*-G₂ rappresenta il gruppo -CO-.

I composti di formula I sono dotati di attività antiproliferativa, antinfiammatoria, antiartritica ed antivirale.

FIRMA DEL/DEI
RICHIEDENTE/I

BRACCO MAURO



7197 M Descrizione del brevetto per invenzione industriale avente per titolo:

FM/mc **"DERIVATI DI N-DEACETILTIOCOLCHICINA, LORO USO E FORMULAZIONI FARMACEUTICHE CHE LI CONTENGONO"**

a nome : **INDENA S.p.A.**

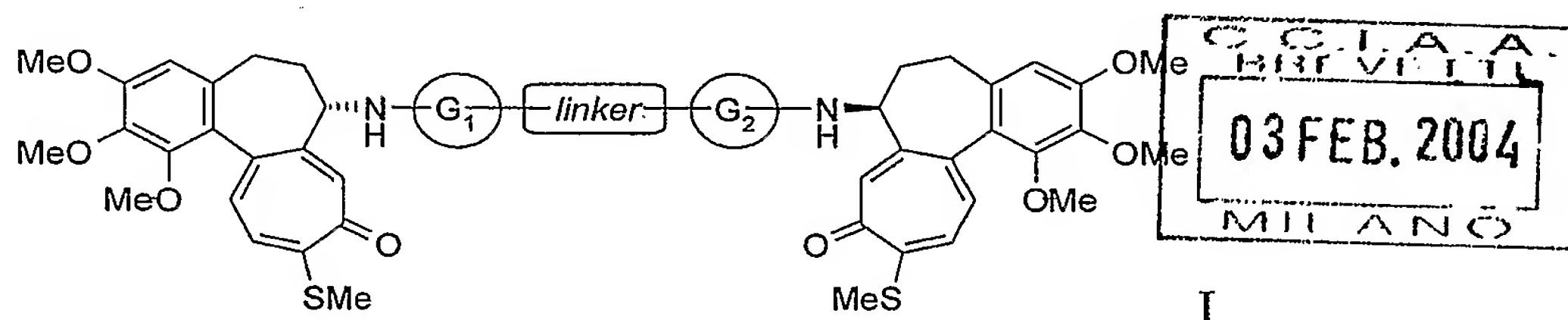
con sede in: **Milano**

* * *

MI 2004 A 0 0 0 1 6 4

DESCRIZIONE DELL'INVENZIONE

La presente invenzione ha per oggetto derivati di N-deacetiltiocolchicina di formula I



in cui:

- il *linker* è un residuo bivalente alchilico lineare o ramificato C₁-C₈, cicloalchilico C₃-C₈, un anello fenilenico o eterociclico C₄-C₆;
- le giunzioni G₁ e G₂, uguali o diverse, sono gruppi -CO-, -CONH-, -CR₂- in cui R₂ rappresenta idrogeno o un residuo alchilico lineare C₁-C₄, oppure il gruppo G₁-*linker*-G₂ rappresenta il gruppo -CO-.

I composti di formula I sono dotati di attività antiproliferativa, antinfiammatoria, antiartritica ed antivirale.

BACKGROUND DELL'INVENZIONE

Colchicina e tiocolchicina sono prodotti conosciuti da tempo nella pratica medica. La colchicina trova impiego nella terapia della gotta e degli stati infiammatori correlati. Il glucoside della 3-O-demetiltiocolchicina trova impiego come miorilassante nella spasticità e dolori muscolari da contrattura.

In entrambi i casi tuttavia l'uso è limitato dall'elevata tossicità dei prodotti.

Infatti colchicina e tiocolchicina sono anche noti composti antiblastici, capaci di destabilizzare i microtubuli per mezzo dell'interazione con la tubulina. Numerosi loro derivati sono stati studiati per un possibile impiego come farmaci antitumorali. A causa del loro basso indice terapeutico nessuno di questi ha avuto successo, con la sola eccezione della demecolcina, introdotta in terapia negli anni Sessanta per il trattamento di forme leucemiche ma poi soppiantato dai più efficaci alcaloidi della *Vinca*.

WO 01/68957 descrive dimeri di tiocolchicina in cui i residui di tiocolchicina sono collegati da un ponte di-ammidico o ammido-ureidico alifatico lineare.

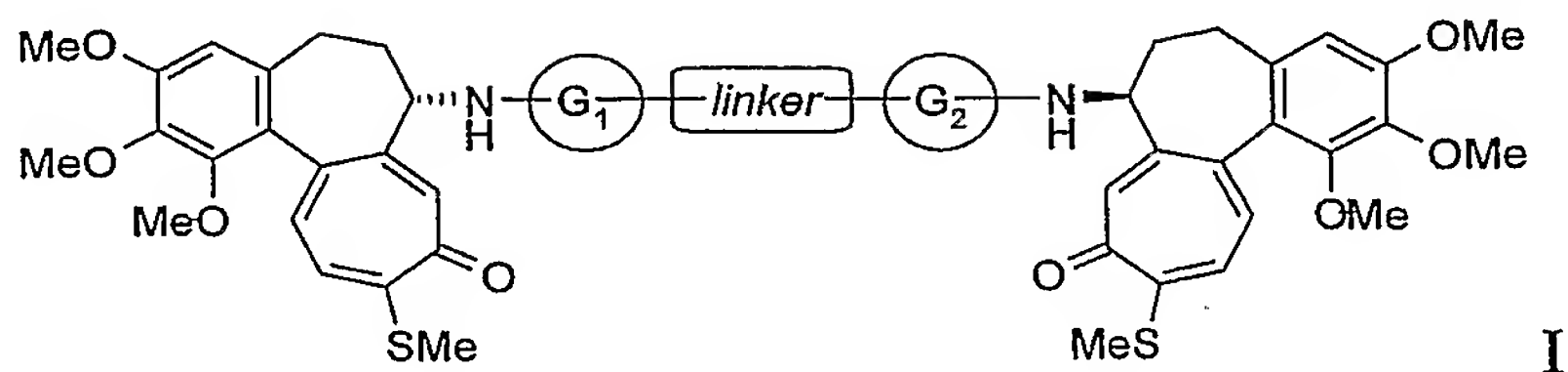
DESCRIZIONE DELL'INVENZIONE

Si è ora trovato che i composti di formula I sono dotati di attività antiproliferativa superiore a quella di colchicina e tiocolchicina, in particolare su cellule esprimenti il fenotipo MDR (Multi-Drug Resistance).

I composti dell'invenzione risultano inoltre vantaggiosi rispetto ai dimeri descritti in WO 01/68597. Si è inoltre trovato che l'introduzione nel *linker* di un residuo basico aromatico innalza di un ordine di grandezza la citotossicità dei composti. L'introduzione di *linkers* in grado di orientare opportunamente i residui tiocolchicinici nello spazio amplifica lo spettro di azione sui tumori resistenti. La citotossicità dei composti di formula I è risultata paragonabile a quella dei più efficaci farmaci antitumorali mentre lo spettro di azione è notevolmente più ampio su tumori resistenti.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

Si descrivono derivati di N-deacetiltiocolchicina di formula



in cui:

- il *linker* è un residuo bivalente alchilico lineare o ramificato C₁-C₈, cicloalchilico C₃-C₈, un anello fenilenico o eterociclico C₄-C₆;
- le giunzioni G₁ e G₂, uguali o diverse, sono gruppi -CO-, -CONH-, -CR₂- in cui R₂ rappresenta idrogeno o un residuo alchilico lineare C₁-C₄, oppure il gruppo G₁-*linker*-G₂ rappresenta il gruppo -CO- con la condizione che quando G₁ e G₂ sono entrambi CO, oppure quando G₁ è -CONH- e G₂ è -CO- il *linker* è diverso da un residuo alchilico.

Esempi di residui bivalenti alchilici comprendono i termini lineari a due, tre, quattro, cinque o sei atomi di carbonio.

Esempi di gruppi cicloalchilici comprendono 1,3-cicloesilene e 1,4-cicloesilene.

Esempi di gruppi fenilenici comprendono 1,2-, 1,3- o 1,4-fenilene.

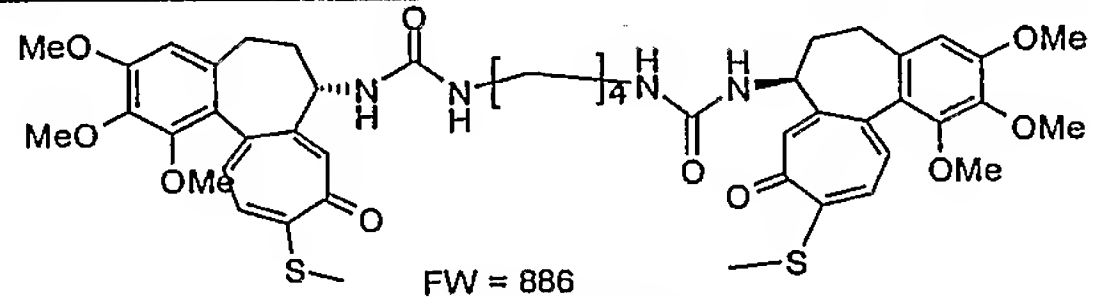
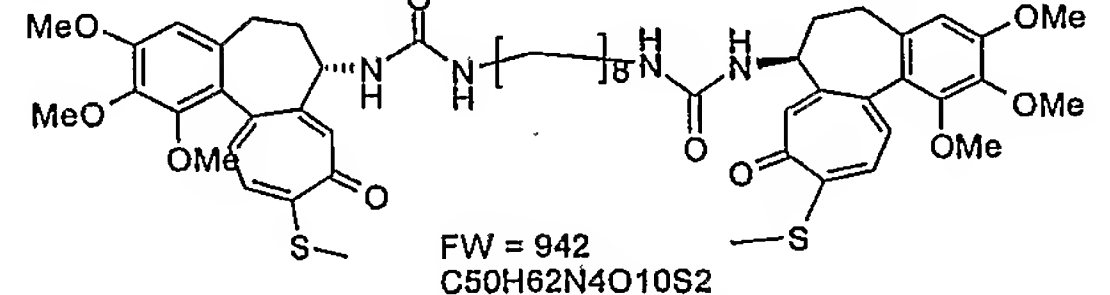
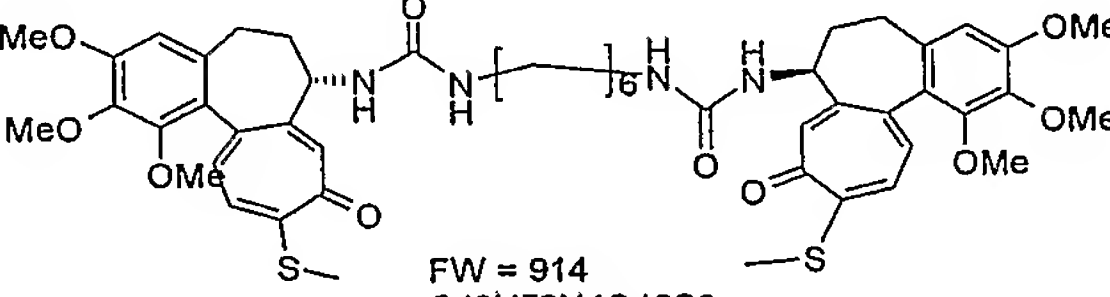
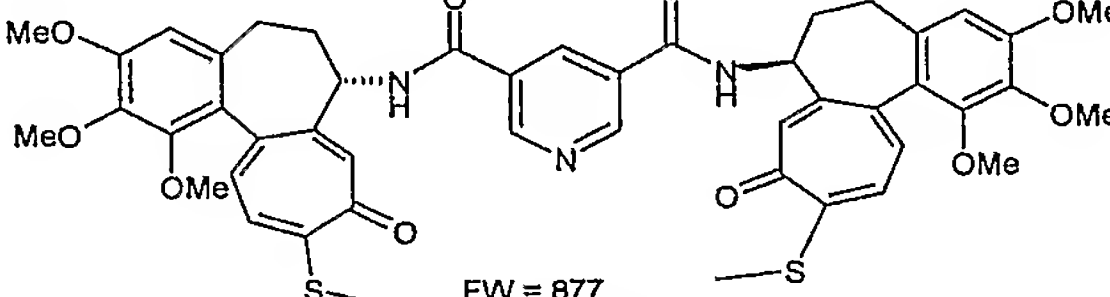
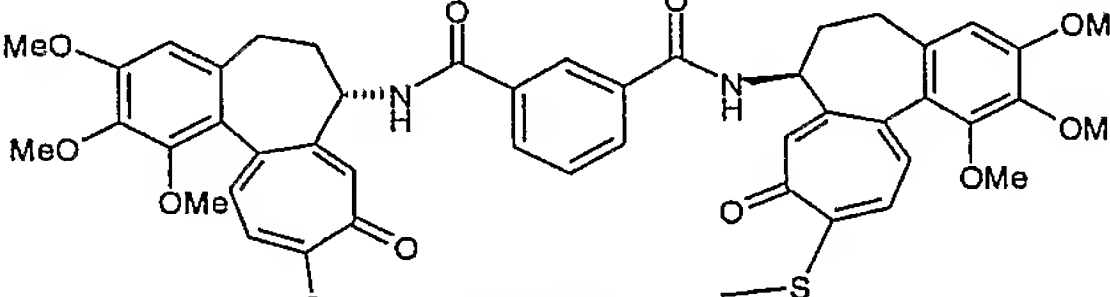
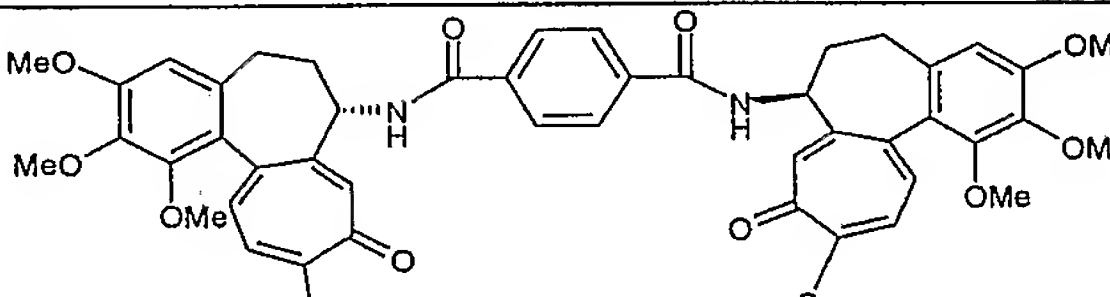
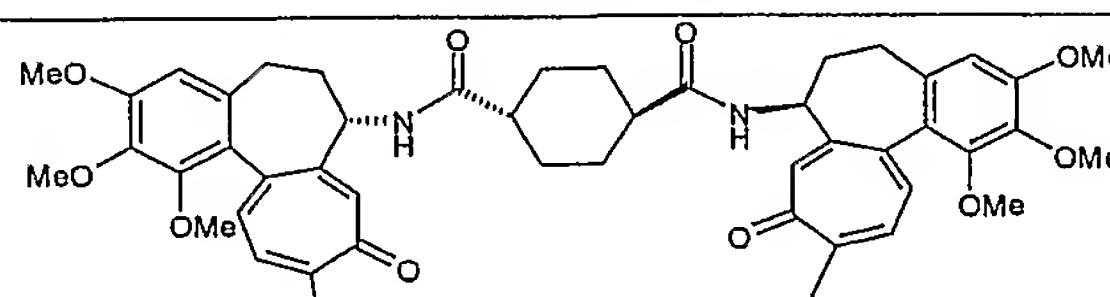
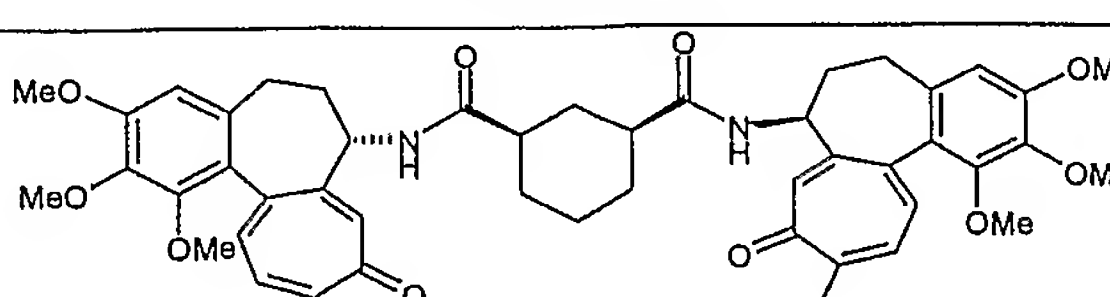
Esempi di gruppi eterociclici comprendono, piridile, pirazinile, pirimidinile, piperidinile, piperazinile legati ai gruppi G₁ e G₂ attraverso due atomi di carbonio dell'anello, ad esempio nelle posizioni 3,5 o 2,5 o 2,6.

G₁ e G₂ sono preferibilmente entrambi CO o CONH.

Il *linker* è preferibilmente un gruppo fenilenico, cicloalchilenico o eterociclico come sopra definito, preferibilmente un gruppo eterociclico comprendente almeno un azoto basico (piridile, pirimidinile, pirazinile, piperidinile).

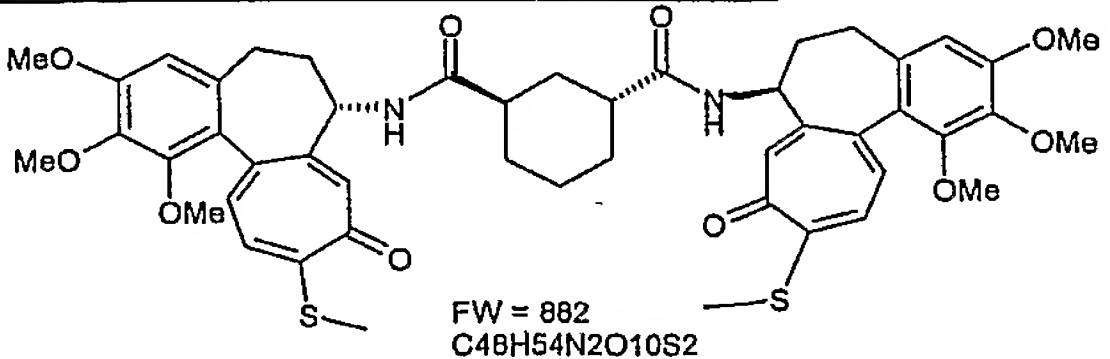
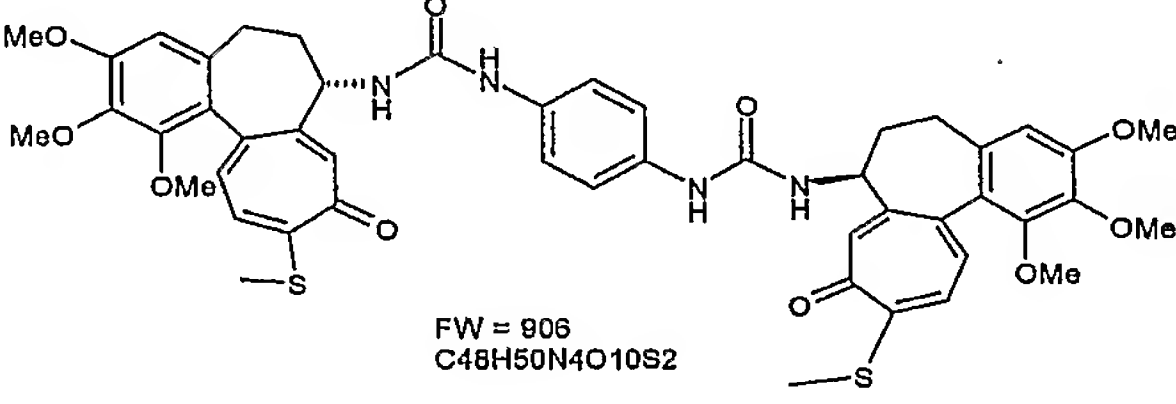
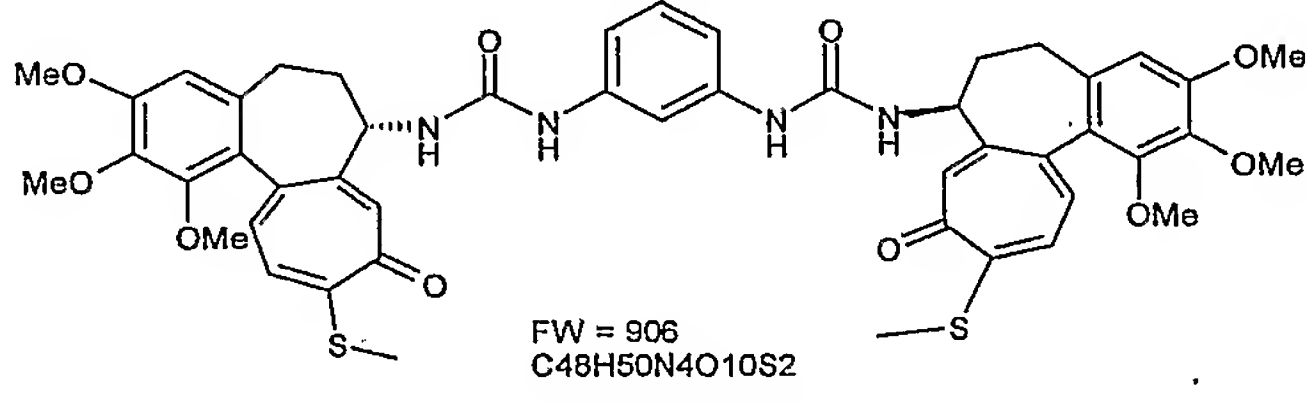
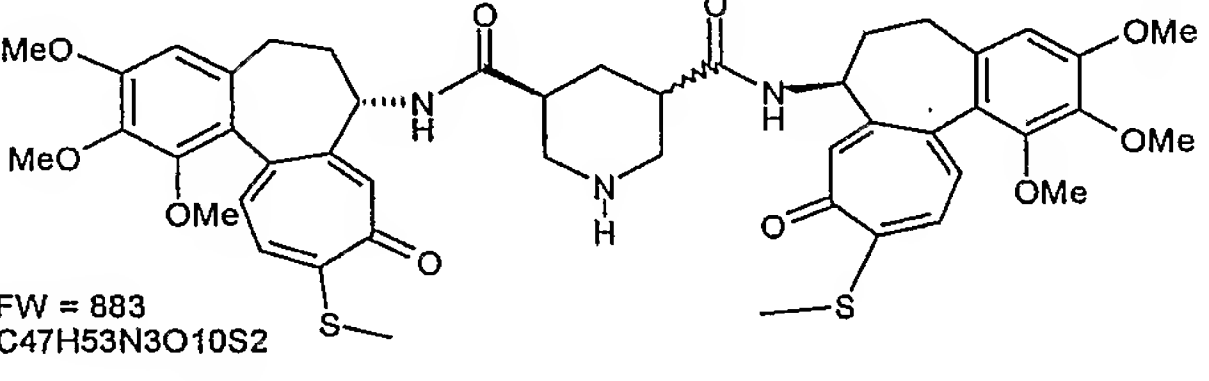
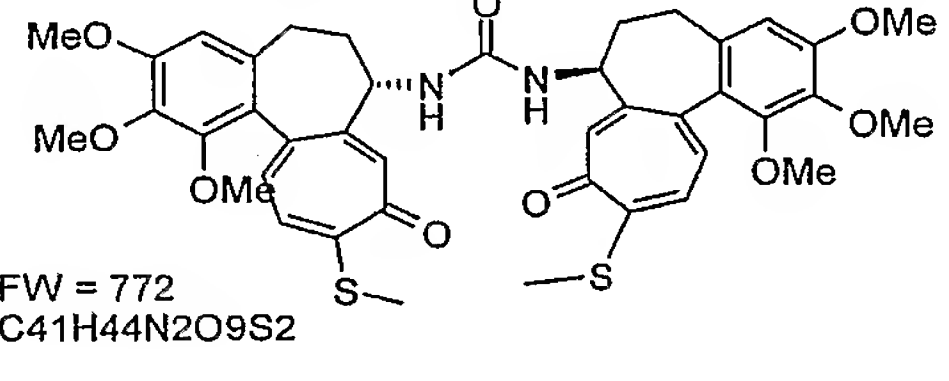
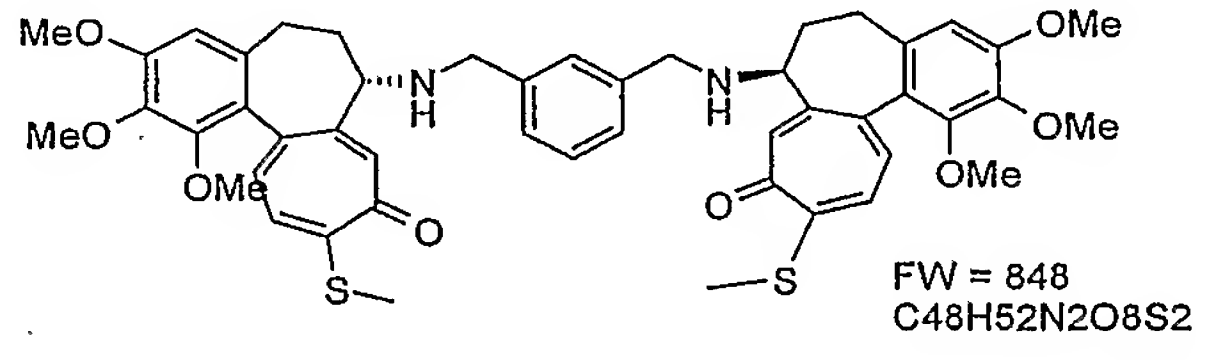
Le formule di struttura di alcuni specifici composti di formula I sono riportati di seguito:

Tabella 1

	 <p>FW = 886 C46H54N4O10S2</p>	
	 <p>FW = 942 C50H62N4O10S2</p>	
	 <p>FW = 914 C48H58N4O10S2</p>	
	 <p>FW = 877 C47H47N3O10S2</p>	
	 <p>FW = 876 C48H48N2O10S2</p>	
	 <p>FW = 876 C48H48N2O10S2</p>	
	 <p>FW = 882 C48H54N2O10S2</p>	
	 <p>FW = 882 C48H54N2O10S2</p>	



Continua

	 <p>FW = 882 C₄₈H₅₄N₂O₁₀S₂</p>	
	 <p>FW = 906 C₄₈H₅₀N₄O₁₀S₂</p>	
	 <p>FW = 906 C₄₈H₅₀N₄O₁₀S₂</p>	
	 <p>FW = 883 C₄₇H₅₃N₃O₁₀S₂</p>	
	 <p>FW = 772 C₄₁H₄₄N₂O₉S₂</p>	
	 <p>FW = 848 C₄₈H₅₂N₂O₈S₂</p>	

I composti di formula I sono dotati di attività antiproliferativa, antinfiammatoria, antiartritica ed antivirale.

I composti della presente invenzione vengono preparati come di seguito descritto. I metodi di preparazione qui riportati sono solo esemplificativi e non limitano in alcun modo l'invenzione.

I composti dell'invenzione di formula I in cui $G_1 = G_2 = \text{CO}$ (bis-

ammidi) sono preparati facendo reagire N-deacetiltiocolchicina con derivati attivati degli acidi bicarbossilici desiderati in solventi inerti. Tra i derivati attivati degli acidi bicarbossilici sono particolarmente preferiti i cloruri degli acidi e le anidridi miste, specie con acido trifluoroacetico. Tra i solventi inerti sono particolarmente preferiti i solventi clorurati. Alternativamente la N-deacetiltiocolchicina viene fatta reagire con l'acido dicarbossilico desiderato in presenza di DMAP (4-N,N-dimetilaminopiridina) e di un agente condensante DCC (dicicloesilcarbodiimmide) a temperatura ambiente, o anche scaldando, e sotto forte agitazione fino a scomparsa dei prodotti di partenza.

I composti dell'invenzione di formula I in cui $G_1 = G_2 = \text{CONH}$ (bis-uree) sono preparati facendo reagire la N-deacetil-tiocolchicina con il bis-isocianato desiderato in un solvente inerte. Quando l'isocianato di scelta non sia commercialmente disponibile, questo viene generato *in situ* per riarrangiamento di Lossen dell'acido idrossamico corrispondente per trattamento con una carbodiimmide e una base. Alternativamente l'isocianato viene generato per trattamento dell'ammide corrispondente con piombo tetraacetato.

I composti in cui G_1 e G_2 sono un gruppo $-\text{CR}_2-$ (bis-ammine) vengono preparati per amminazione riducente della N-deacetiltiocolchicina con le opportune dialdeidi. Alternativamente le bis-ammine vengono ottenute alchilando l'azoto della tiocolchicina con gli opportuni alogeno o tosilderivati. In rari casi le bis-ammine vengono preparate dalle bis-ammidi corrispondenti per riduzione con borani.

I composti con G_1 e G_2 diversi vengono preparati in due stadi attraverso

una combinazione dei metodi sopra citati.

L'attività dei composti di formula I è stata verificata su un ampio numero di cellule tumorali esprimenti diversa resistenza. L'attività più interessante si è osservata per le linee di tumore di ovaio, colon, fegato e pancreas.

Nella tabella 2 sono riportati le IC₅₀ espresse in nano moli di alcuni composti dell'invenzione in paragone al dimero descritto nell'Esempio 3 di WO 00/68597.

Tabella 2 - IC₅₀¹ espresse in nMoles di dimeri di tiocolchicina dopo 72 ore

Composti	IC ₅₀ (nM) ± S.E.						
	MCF7 (breast)	MCF7-R (MDR+)	A2780 (Ovarian)	A2780/dx (Pgp+)	A2780/top (resistente a topotecan)	A2780/pt (resistente a tociplatino)	Widr (colon)
Es. 3 di WO 00/68597	7,9 ± 0,5	33 ± 2,8	238 ± 74	697 ± 192	288 ± 13	252 ± 0,7	351 ± 4
Es. 1	0,7 ± 0,1	72 ± 4,3	3 ± 0,4	806 ± 286	6,9 ± 4,2	3,7 ± 0,6	25 ± 26,4
Es. 3	1,5 ± 0,1	108 ± 14	8 ± 5,6	922 ± 164	5,5 ± 0,1	23 ± 4,6	48 ± 24
Es. 2	14 ± 0,9	135 ± 11	37 ± 5	1273 ± 382	32 ± 24	26 ± 1,0	230 ± 166
Es. 4			252 ± 38	3841 ± 224	152 ± 36	331 ± 63	650 ± 40

¹ IC₅₀: concentrazione inibente del 50% la crescita cellulare rispetto a cellule non trattate.

L'attività citotossica è stata valutata secondo la metodologia descritta da M.C. Alley et al., *Cancer Research* 1998, 48, 589-601.

Tutti i composti di dimerizzazione della tiocolchicina con i gruppi spazianti rivendicati hanno dimostrato possedere attività antiproliferativa,

antinfiammatoria ed antivirale. Questi composti sono pertanto utili nel trattamento di neoplasie di varia origine, di artrite reumatoide deformante e nel trattamento del tumore di Kaposi la cui componente da retrovirus è accertata. L'azione inibente la moltiplicazione virale abbinata a quella antiproliferativa cellulare su tessuti in attiva proliferazione è di particolare interesse tenendo conto dell'origine di molti tumori umani.

A tale scopo, i composti dell'invenzione saranno somministrati sotto forma di composizioni farmaceutiche adatte alla somministrazione endovenosa, parenterale, orale, transdermica. Particolarmente utile ed è uno dei punti dell'invenzione riguarda la preparazione di complessi con proteine plasmatiche, in particolare di albumina umana ingegnerizzata. I complessi proteici di questi derivati si ottengono aggiungendo ad una soluzione concentrata di albumina il composto sciolto in diossano in un tempo tale da permettere la reazione fra le specie molecolari interessate. Dopo aver lasciato reagire in condizioni fisiologiche di pH e di forza ionica le due specie molecolari, albumina e derivato colchicinico la risultante soluzione si liofilizza. Se il liofilizzato viene preparato in condizioni di assoluta sterilità il liofilizzato è pronto per un uso iniettivo endovenoso; questo liofilizzato disperso in eccipienti convenienti e compatibili può essere compresso e somministrato per via orale dando luogo a concentrazioni plasmatiche di farmaco vicine a quelle ottenibili per via parenterale. In alternativa all'uso di proteine plasmatiche, data la scarsa solubilità in acqua dei composti possono essere vantaggiosamente impiegate ciclodestrine variamente funzionalizzate e matrici acriliche di possibile somministrazione umana per via parenterale.

A seconda della via di somministrazione il dosaggio dei composti potrà



variare da 1 a 20 mg/m² di superficie corporea. La via di somministrazione preferita è quella iniettiva loco-regionale, endovenosa ed orale.

Esempi di composizioni comprendono fiale liofilizzate, compresse di liofilizzati supportati e soluzioni bevibili. Ogni altro agente solubilizzante i composti con grado di accettabilità di somministrazione quali Tween, Cremophor e loro miscele opportune con PEG o alcoli possono rientrare in questa invenzione.

I seguenti esempi illustreranno l'invenzione in maggiore dettaglio.

ESEMPI

Esempio 1 - Acido 3,5-piridindicarbossilico bis-(N-deacetiltiocolchicina) ammido

Si sciolgono 10 g di N-deacetiltiocolchicina in 60 mL di cloruro di metilene. Si aggiungono quindi sotto vigorosa agitazione 2,24 g (0,5 e.q.) di acido 3,5-piridincarbossilico, 1,64 g (0,5 e.q.) di N,N-dimetilaminopiridina (DMAP) e 8,3 g (1,5 e.q.) di dicicloesilcarbodiimmide (DCC). Si lascia la miscela sotto agitazione monitorando la reazione per TLC (AcOEt:MeOH 10:1) fino a scomparsa dei reagenti (circa 12 ore). Si filtra quindi la soluzione su celite lavando il letto con cloruro di metilene (2x100 mL). Le fasi organiche riunite vengono lavate prima con pari volume di HCl 1N e successivamente con NaOH 1N. La fase organica viene seccata su sodio solfato ed evaporata sotto vuoto. Il residuo viene purificato per filtrazione su gel di silice (AcOEt:MeOH 10:1). Il prodotto così ottenuto viene seccato in stufa a 40°C sotto vuoto per una notte a dare 7,5 g di prodotto finale.

¹HNMR (300 MHz, CDCl₃): 1,00-1,42 (m, 2H), 1,50-2,00 (m, 2H), 2,05-2,30 (m, 2H), 2,30-2,50 (m, 2H), 2,52 (s, 3H, SMe), 3,71 (s, 3H, MeO-

1), 3,90 (s, 3H, MeO-2), 3,96 (s, 3H, MeO-3), 4,80-4,92 (m, 2H, H-7), 6,47 (s, 2H, H-8), 7,18 (d, 12,0 Hz, 2H, H-12), 7,38 (d, 12,0 Hz, 2H, H-11), 7,67 (s, 2H, H-4), 8,52 (br s, 2H, NH), 9,28 (s, 2H, H-2'+H-6'), 9,60 (s, 1H, H-4');

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): 182,64, 164,25, 158,88, 154,12, 152,59, 152,34, 151,33, 141,92, 139,33, 135,48, 134,47, 132,74, 129,04, 128,54, 127,48, 125,71, 107,74, 61,88, 61,61, 56,49, 53,03, 30,09, 15,41.

IR (KBr): 2934, 2854, 1664, 1605, 1540, 1485, 1424, 1403, 1349, 1321, 1266, 1235, 1195, 1153, 1137, 1095, 1051, 1021, 978, 921, 842, 796, 703.

Esempio 2 - Acido *trans*-1,4-cicloesandicarbossilico bis-(N-deacetiltiocolchicina) ammido

Si sciolgono 10 g di N-deacetiltiocolchicina in 60 mL di cloruro di metilene. Si aggiungono quindi sotto vigorosa agitazione 2,31 g (0,5 e.q.) di acido *trans*-1,4-cicloesandicarbossilico, 1,64 g (0,5 e.q.) di DMAP e 8,3 g (1,5 e.q.) di DCC. Si lascia sotto agitazione per 12 ore controllando per TLC (AcOEt:MeOH 10:1). Si filtra su celite lavando il letto con cloruro di metilene (2x20 mL). Le fasi organiche riunite vengono lavate con pari volume di HCl 1N, NaOH 1N e brine. Si secca su Na_2SO_4 e si evapora il solvente a pressione ridotta. Il residuo viene purificato per cromatografia diretta su colonna (AcOEt:MeOH 12:1). Il prodotto viene cristallizzato da metanolo (10 v/v) e seccato in stufa per una notte a 40°C sotto vuoto a dare 6,6 g di composto puro.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 1,30-1,45 (m), 1,45-1,70 (m, 2H), 1,80-1,89 (m), 1,89-2,10 (m), 2,18-2,56 (m), 2,43 (s, 3H, SMe), 3,69 (s, 3H, MeO-1), 3,92 (s, 3H, MeO-2), 3,97 (s, 3H, MeO-3), 4,80-4,92 (m, 2H, H-7), 6,47

(s, 2H, H-8), 7,09 (d, 12,0 Hz, 2H, H-12), 7,34 (d, 12,0 Hz, 2H, H-11), 7,86 (s, 2H, H-4), 8,93 (br s, 2H, NH).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): 182,44, 176,35, 158,52, 153,80, 152,96, 151,55, 141,97, 139,22, 135,04, 134,69, 129,93, 127,09, 126,37, 107,04, 62,39, 61,68, 56,45, 51,13, 44,59, 36,92, 30,63, 29,61, 27,84, 15,36.

IR (KBr): 3442, 3285, 2934, 2855, 1674, 1602, 1532, 1484, 1454, 1424, 1403, 1390, 1348, 1321, 1281, 1256, 1236, 1195, 1153, 1136, 1094, 1022, 982, 942, 921, 841, 619, 582.

Esempio 3 - Acido 3,5-benzendicarbossilico bis-(N-deacetiltiocolchicina) ammido

Si opera come descritto nell'esempio 1 a partire da 5 g di acido isoftalico per ottenere il prodotto come solido cristallino con 82% di resa.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 1,00-1,42 (m, 2H), 1,50-2,00 (m, 2H), 2,05-2,30 (m, 2H), 2,30-2,50 (m, 2H), 2,52 (s, 3H, SMe), 3,71 (s, 3H, MeO-1), 3,90 (s, 3H, MeO-2), 3,96 (s, 3H, MeO-3), 4,80-4,92 (m, 2H, H-7), 6,47 (s, 2H, H-8), 7,18 (d, 12,0 Hz, 2H, H-12), 7,38 (d, 12,0 Hz, 2H, H-11), 7,67 (s, 2H, H-4), 8,52 (br s, 2H, NH), 8,05 (m, 2H, H-4'+H-6'), 8,50 (m, 1H, H-2'), 7,46 (dd, 8,0 Hz, H-5').

Esempio 4 - N-deacetiltiocolchicina 1,4-fenilendiammina bis-urea

Si sciolgono 2,0 g di N-deacetiltiocolchicina in 150 mL di tetraidrofurano anidro. Si aggiungono quindi 0,5 equivalenti di 1,4-fenilene diisocianato (0,4 g). La miscela di reazione viene lasciata sotto agitazione a temperatura ambiente per due giorni, controllando tramite TLC (DCM-EtOH 95:5, $R_f=0,30$). Si evapora il solvente e si ricristallizza il grezzo da etilacetato per ottenere 0,95 g di prodotto puro (38%).

¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆): 1,72-1,88 (m), 2,08-2,36 (m), 2,58-2,70 (m), 2,42 (s, 3H, SMe), 3,58 (s, 3H, MeO-1), 3,82 (s, 3H, MeO-2), 3,87 (s, 3H, MeO-3), 4,24-4,35 (m, 2H, H-7), 6,82 (s, 2H, H-8), 7,17 (d, 12,0 Hz, 2H, H-12), 7,27 (d, 12,0 Hz, 2H, H-11), 7,13 (s, 2H, H-4), 8,52 (br s, 2H, NH).

Esempio 5 - N-deacetiltiocolchicina 1,3-fenilendiammina bis-urea

Si opera come nell'esempio V partendo da 2,0 g di N-deacetiltiocolchicina e da 0,4 g di 1,3-fenilene diisocianato per ottenere il prodotto desiderato con 42% di resa.

¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆): 1,72-1,88 (m), 2,08-2,36 (m), 2,58-2,68 (m), 2,43 (s, 3H, SMe), 3,58 (s, 3H, MeO-1), 3,83 (s, 3H, MeO-2), 3,87 (s, 3H, MeO-3), 4,24-4,35 (m, 2H, H-7), 6,82 (s, 2H, H-8), 7,18 (d, 12,0 Hz, 2H, H-12), 7,28 (d, 12,0 Hz, 2H, H-11), 7,14 (s, 2H, H-4), 8,48 (br s, 2H, NH).

Esempio 6 - Acido 2,9-diazasebacico bis-(N-deacetiltiocolchicina) ammido

Si opera come nell'esempio V partendo da 2,0 g di N-deacetiltiocolchicina e da 0,4 g di 1,4-butan diisocianato per ottenere il prodotto desiderato con 63% di resa (0,4 g). TLC (DCM-EtOH=95:5) R_f=0,38.

¹HNMR (300 MHz, CDCl₃): 1,80-1,95 (m), 2,38-2,54 (m), 2,70-2,95 (m), 3,40-3,60 (m), 2,50 (s, 3H, SMe), 3,69 (s, 3H, MeO-1), 3,95 (s, 3H, MeO-2), 3,98 (s, 3H, MeO-3), 4,54-4,65 (m, 2H, H-7), 6,58 (s, 2H, H-8), 7,21 (d, 12,0 Hz, 2H, H-12), 7,43 (d, 12,0 Hz, 2H, H-11), 7,81 (s, 2H, H-4), 8,20 (br s, 2H, NH).

Esempio 7 - 1,3-benzenmetilen-bis-N-deacetiltiocolchicina

Si sciolgono 2,0 g di N-deacetiltiocolchicina in 100 mL di cloroformio.



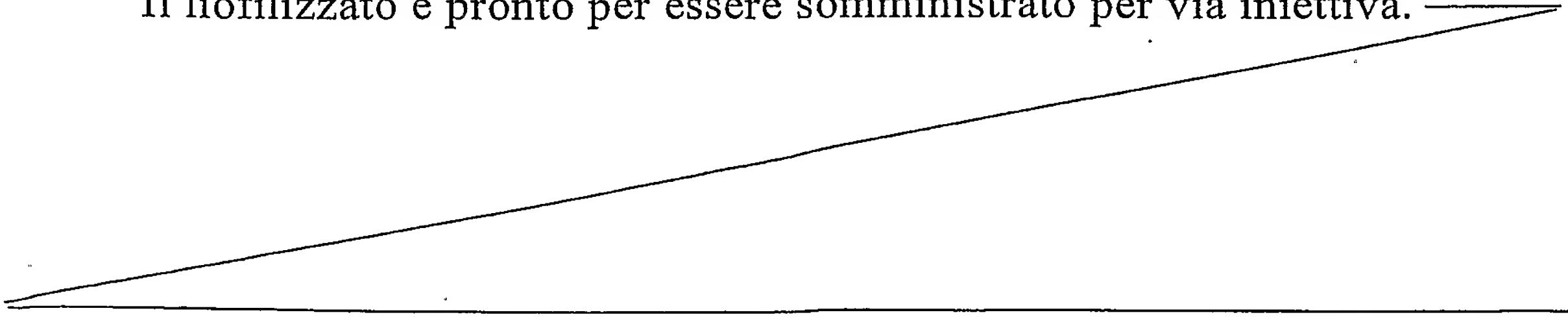
Si aggiungono 0,5 equivalenti di aldeide isoftalica dimetilacetale e 0,01% di piridinio tosilato. Si lascia a riflusso per una notte. Si raffredda quindi a temperatura ambiente e quindi in bagno di ghiaccio. Si aggiungono 8 equivalenti di sodio triacetossi boroidruro e si lascia sotto agitazione per 1 giorno. La soluzione viene quindi filtrata, lavata con uguale volume di 0,1 N HCl e poi sodio bicarbonato acquoso saturo. La fase organica viene asciugata su sodio solfato e il solvente evaporato. Il grezzo viene purificato per flash cromatografia a dare 0,49 g di prodotto.

$^1\text{HNMR}$ (300 MHz, CDCl_3): $^1\text{HNMR}$ (300 MHz, CDCl_3): 1,00-1,42 (m, 2H), 1,50-2,00 (m, 2H), 2,05-2,30 (m, 2H), 2,30-2,50 (m, 2H), 2,52 (s, 3H, SMe), 3,71 (s, 3H, MeO-1), 3,90 (s, 3H, MeO-2), 3,96 (s, 3H, MeO-3), 4,80-4,92 (m, 2H, H-7), 6,47 (s, 2H, H-8), 7,18 (d, 12,0 Hz, 2H, H-12), 7,38 (d, 12,0 Hz, 2H, H-11), 7,67 (s, 2H, H-4), 8,52 (br s, 2H, NH), 7,02 (m, 5H).

Esempio 8 - Formulazione per uso iniettabile di acido 3,5-piridindicarbossilico bis-(N-deacetiltiocolchicina) ammidato complessato con albumina umana

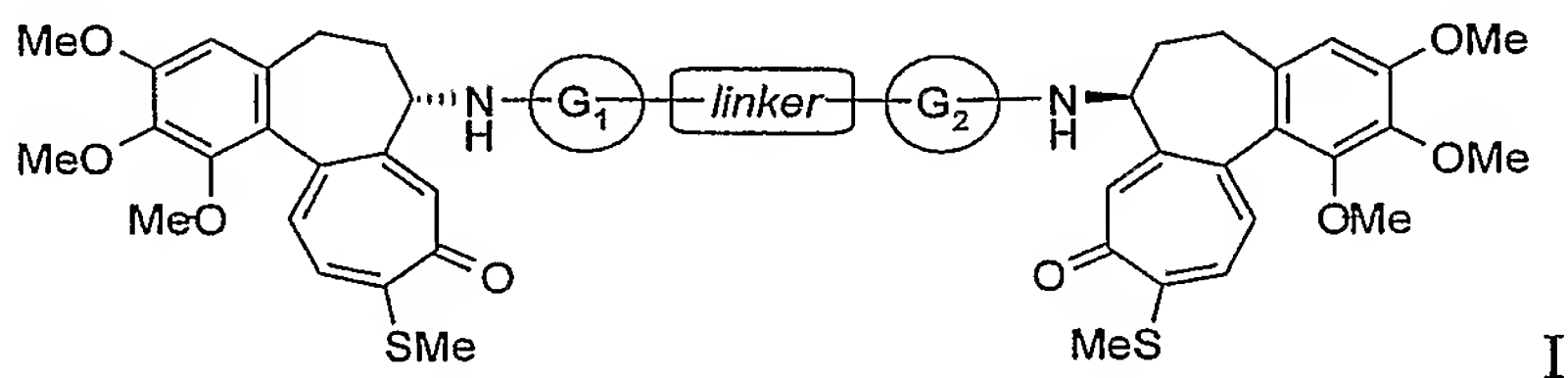
Si scioglie 1 g di acido 3,5-piridindicarbossilico bis-(N-deacetiltiocolchicina) ammidato in 20 mL di diossano. Si gocciola lentamente la soluzione così preparata in una soluzione di albumina al 5% in fisiologica fino all'ottenimento di una sospensione lattescente omogenea. Si lascia sotto agitazione e in condizioni sterili per due ore, quindi si liofilizza.

Il liofilizzato è pronto per essere somministrato per via iniettiva.



RIVENDICAZIONI

1. Composti di formula I



in cui:

- il *linker* è un residuo bivalente alchilico lineare o ramificato C₁-C₈, cicloalchilico C₃-C₈, un anello fenilenico o eterociclico C₄-C₆;
- le giunzioni G₁ e G₂, uguali o diverse, sono gruppi -CO-, -CONH-, -CR₂- in cui R₂ rappresenta idrogeno o un residuo alchilico lineare C₁-C₄,

oppure il gruppo G₁-*linker*-G₂ rappresenta il gruppo -CO-

con la condizione che quando G₁ e G₂ sono entrambi CO, oppure quando G₁ è -CONH- e G₂ è -CO- il *linker* è diverso da un residuo alchilico bivalente.

2. Composti secondo la rivendicazione 1 in cui G₁ e G₂ sono entrambi CO o CONH.
3. Composti secondo la rivendicazione 1 o 2 in cui il *linker* è un gruppo fenilenico, C₅-C₆ cicloalchilenico o eterociclico.
4. Composti secondo la rivendicazione 1 o 2 in cui il *linker* è scelto fra residui alchilici bivalenti lineari aventi da due a sei atomi di carbonio.
5. Composti secondo la rivendicazione 1 o 2 in cui il *linker* è scelto fra 1,3-cicloesilene e 1,4-cicloesilene.
6. Composti secondo la rivendicazione 1 o 2 in cui il *linker* è scelto fra 1,2-, 1,3- o 1,4-fenilene.

7. Composti secondo la rivendicazione 1 o 2 in cui il *linker* è scelto fra piridile, piperidinile, piperazinile legati ai gruppi G₁ e G₂ nelle posizioni 3,5 o 2,5 o 2,6.

8. I composti di formula I per uso antitumorale, antiartritico, antinfiammatorio e antivirale.

9. Composizioni farmaceutiche contenenti i composti di formula I come ingrediente attivo in miscela con opportuni veicoli e/o eccipienti.

Milano, 3 febbraio 2004

Il Mandatario
(Bracco Mauro)
di Bianchetti Bracco Minoja S.r.l.

